

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N 33/566, G01N 33/50, G01N 33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N 33/566, G01N 33/50, G01N 33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 97/46677, A (株式会社ビー・エム・エル) 11. 12月. 1997 (11. 12. 97) & US, 6040426, A	1 - 4
A	Nagata et al. 「Selective Expression of a Novel Surface Molecule by Human Th2 Cells In Vivo」 J. Immunol., Vol. 162, P. 1278-1286 (Feb. 1999)	1 - 4
P, A	BIOSIS No. 199900523261 & FEBS Letters, Vol. 459, No. 2, P. 195-199 (Oct. 1999)	1 - 4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.10.00

国際調査報告の発送日

17.1000

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

印

2J

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	BIOSIS No. 199900124875 & Gene, Vol. 227, No. 1, P. 71-77 (Feb. 1999)	1 - 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05615

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N 33/566, G01N 33/50, G01N 33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N 33/566, G01N 33/50, G01N 33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 97/46677, A (BML, Inc.), 11 December, 1997 (11.12.97) & US, 6040426, A	1-4
A	Nagata et al., "Selective Expression of a Novel Surface Molecule by Human Th2 Cells In Vivo", J. Immunol., Vol.162, pp.1278-1286 (Feb.1999)	1-4
P, A	BIOSIS No.199900523261 & FEBS Letters, Vol.459, No.2, pp.195-199 (Oct.1999)	1-4
A	BIOSIS No.199900124875 & Gene, Vol.227, No.1, pp.71-77 (Feb.1999)	1-4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing
date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means
"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
04 October, 2000 (04.10.00)

Date of mailing of the international search report
17 October, 2000 (17.10.00)

Name and mailing address of the ISA
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PBM42 PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT IPEA 416)	
International application No PCT JP00 05615	International filing date (day month year) 22 August 2000 (22.08.00)	Priority date (day month year) 23 August 1999 (23.08.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33 566, 33 50, 33 15		
Applicant BML INC.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36	
2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.	
<input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT)	
These annexes consist of a total of _____ sheets	
3. This report contains indications relating to the following items	
I <input checked="" type="checkbox"/>	Basis of the report
II <input type="checkbox"/>	Priority
III <input type="checkbox"/>	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV <input type="checkbox"/>	Lack of unity of invention
V <input checked="" type="checkbox"/>	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement
VI <input type="checkbox"/>	Certain documents cited
VII <input type="checkbox"/>	Certain defects in the international application
VIII <input type="checkbox"/>	Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 06 November 2000 (06.11.00)	Date of completion of this report 18 June 2001 (18.06.2001)
Name and mailing address of the IPI A JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No

PCT/JP00/05615

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application *

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets fig. _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)) **

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT JP00 05615

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-4	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-4	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-4	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The subject matters of claims 1-4 are not described in the documents cited in the ISR and documents recognized to be pertinent to the present invention, and they appear to be non-obvious to a person skilled in the art.

P C T

REC'D 06 JUL 2001

WIPO

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)

{PCT36条及びPCT規則70}

出願人又は代理人 の書類記号 PBM42/PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/05615	国際出願日 (日.月.年) 22.08.00	優先日 (日.月.年) 23.08.99
国際特許分類 (IPC) Int.Cl ⁷ G01N 33/566, G01N 33/50, G01N 33/15		
出願人 (氏名又は名称) 株式会社 ビー・エム・エル		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 06.11.00	国際予備審査報告を作成した日 18.06.01	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 新見 浩一 印	2 J 9162
電話番号 03-3581-1101 内線 3252		

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性（N）

請求の範囲 1 - 4 有
請求の範囲 無

進歩性（IS）

請求の範囲 1 - 4 有
請求の範囲 無

産業上の利用可能性（IA）

請求の範囲 1 - 4 有
請求の範囲 無

2. 文献及び説明（PCT規則70.7）

請求の範囲 1 - 4 に記載された発明は、国際調査報告に表示された文献及び当該発明に関連があると認められる文献に記載されておらず、当業者にとって自明なものでもない。

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
(PCT18条、PCT規則43、44)

出願人又は代理人 の書類記号 PBM42/PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/05615	国際出願日 (日.月.年) 22.08.00	優先日 (日.月.年) 23.08.99
出願人(氏名又は名称) 株式会社 ビー・エム・エル		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ G01N 33/566, G01N 33/50, G01N 33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ G01N 33/566, G01N 33/50, G01N 33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 97/46677, A (株式会社ビー・エム・エル) 11. 12月. 1997 (11. 12. 97) & US, 6040426, A	1 - 4
A	Nagata et al. 「Selective Expression of a Novel Surface Mole- cule by Human Th2 Cells In Vivo」 J. Immunol., Vol. 162, P. 1278-1286 (Feb. 1999)	1 - 4
P, A	BIOSIS No. 199900523261 & FEBS Letters, Vol. 459, No. 2, P. 195-199 (Oct. 1999)	1 - 4

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.10.00

国際調査報告の発送日

17.1000

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

2 J 9162

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	BIOSIS No.199900124875 & Gene, Vol. 227, No. 1, P. 71-77 (Feb. 1999)	1 - 4

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, C07K 14/435, C12P 21/08	A1	(11) 国際公開番号 WO97/46677 (43) 国際公開日 1997年12月11日(11.12.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/01906 (22) 国際出願日 1997年6月5日(05.06.97) (30) 優先権データ 特願 88166793 1996年6月5日(05.06.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ビー・エム・エル(BML, INC.)(JP/JP) 〒151 東京都渋谷区千駄ヶ谷5丁目21番3号 Tokyo, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 小川 一行(OGAWA, Kazuyuki)(JP/JP) 田中 和也(TANAKA, Kazuya)(JP/JP) 永田 欽也(NAGATA, Kinya)(JP/JP) 高野 昇 (TAKANO, Syoichi)(JP/JP) 〒350-11 埼玉県川越市市場1361番地1 株式会社 ビー・エム・エル 総合研究所内 Saitama, (JP) (74) 代理人 弁理士 志村光春(SHIMURA, Mitsuharu) 〒150 東京都渋谷区桜丘町9-3 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: PROTEIN SPECIFIC TO HUMAN Th2, GENE (B19) ENCODING THE SAME, AND TRANSFORMANT, RECOMBINANT VECTOR AND MONOCLONAL ANTIBODY RELATING THERETO (54) 発明の名称 ヒトTh2特異的タンパク質及びこれをコードする遺伝子(B19)並びにこれに関連する形質転換体、組換えベクター及びモノクローナル抗体 (57) Abstract A gene (B19) specific exclusively to human Th2 which has been prepared and identified by the subtraction method; a recombinant vector having this gene integrated therein; a transformant transformed by this vector; a protein specific to human Th2 encoded by the above-mentioned gene originating in the transformant; a monoclonal antibody against this human Th2-specific protein, and the use of the above-mentioned gene, protein, antibody, etc., in the identification or correction of the polarization in the distribution of Th1 and Th2, which are the subsets of helper T cells, to thereby establish means for identifying the progression or type of immunological diseases based on the information thus obtained.		

a レーン 1 1P04 (Th1 タイプ)
 b レーン 2 2P15 (Th1 タイプ)
 c レーン 3 2P26 (Th2 タイプ)
 d レーン 4 KND4 (Th2 タイプ)

a SEQUENCE 1 : 1P04 (TYPE Th1)
 b SEQUENCE 2 : 2P15 (TYPE Th1)
 c SEQUENCE 3 : 2P26 (TYPE Th2)
 d SEQUENCE 4 : KND4 (TYPE Th2)

(57) 要約

本発明は、ヘルパーT細胞のサブセットである、Th1とTh2との分布の極性化における知見に基づく免疫関連疾患の病勢や病型の特定手段を確立することを、その課題として提供された発明である。より具体的には、ヒトTh2にのみ特異的な遺伝子(B19)をサブトラクション法により調製・特定し、この遺伝子を組み込んだ組換えベクターとこの組換えベクターで形質転換された形質転換体、この形質転換体に由来する上記遺伝子がコードするヒトTh2特異的タンパク質、さらにはこのヒトTh2特異的タンパク質を抗原とするモノクローナル抗体を製造して、これらの遺伝子、タンパク質及び抗体等を、Th1とTh2との分布の極性化の特定手段や是正手段として用いることにより、この課題を解決し得る発明である。

参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	SG	シンガポール
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロベニア
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LV	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
RA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ共和国	ID	インドネシア
BE	ベルギー	GM	ギニア	MG	マダガスカル	TG	タンザニア
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	ML	マリ	TH	タイ
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	TR	トルコ
BK	ブラジル	IE	アイルランド	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
BY	ベラルーシ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CA	カナダ	IS	アイスランド	NE	ニジェール	US	米国
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	NL	オランダ	BZ	ベリーズ
CG	コンゴ	JP	日本	NO	ノルウェー	VN	ベトナム
CH	スイス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
CJ	コート・ジボアール	KG	キルギスタン	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	KR	韓国	PT	ポルトガル		
CN	中国	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
CU	キューバ	LC	セントルシア	RU	ロシア連邦		
CZ	チェコ共和国	LI	リヒテンシュタイン	SD	スーダン		
DE	ドイツ	LK	スリランカ	SE	スウェーデン		

明 細 書

ヒトTh2特異的タンパク質及びこれをコードする遺伝子(B19)並びにこれに関連する形質転換体、組換えベクター及びモノクローナル抗体

技術分野

本発明は、Th2特異的タンパク質及びこれをコードする遺伝子並びにこれに関連する形質転換体、組換えベクター及びモノクローナル抗体に関する発明である。

より詳細には、アトピー性疾患の発症、エイズの劇症化等に深く関わるヘルパーT細胞群におけるバランスの変化を迅速かつ簡便に特定する手段として用いることができる2型ヘルパーT細胞にのみ特異的なタンパク質及びこれをコードする遺伝子に関する発明である。

また、本発明はこの遺伝子を組み込んだ遺伝子発現用組換えベクター、このベクターで形質転換した形質転換体に関する発明である。

さらに、本発明は上記のTh2遺伝子特異的タンパク質を抗原とするモノクローナル抗体及びこのモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマに関する発明である。

背景技術

近年、免疫学は驚くべき進歩を見せ、その医学分野における貢献は多大である。

免疫学は、感染免疫、腫瘍免疫、アレルギー、アナフィラキシー等のどのような免疫反応でも、その促進と抑制の中心的役割を果たしているのは、マクロファージやリンパ球等が産生するサイトカインであることを既に明らかにしている。

Mosmann とCoffman らは、マウス脾細胞から樹立した長期培養可能なCD4⁺T細胞クローンを、その産生するサイトカインの違いから異なる2つのサブセットに分類した(Mosmann, T.R., et al., J. Immunol., 136, 2348(1986))。

すなわち、主にIL-4, IL-5, IL-6, IL-10及びIL-13を

産生する「T-helper 2 (Th 2)」と、主にIL-2, IFN- γ 及びTNF- β を産生する「T-helper 1 (Th 1)」とに分類した。

ヒトにおいては、当初このようなヘルパーT細胞のサブセットの存在は疑問視されていたが、現在ではその存在が明らかに認められている (Romagnani, S., Immunology Today 12, 256(1991)等)。

現在、これらのマウスやヒトのヘルパーT細胞サブセットTh 2, Th 1の性状や機能がますます明らかになりつつあり、多くの免疫反応の調節にあずかる中心細胞としての生物学的意義が注目されている。

また、多くの感染症や免疫学的疾患では、患者リンパ球のTh 1/Th 2サブセットの分布においては、そのいずれかに極端に偏る極性化が起こり、この極性化がその疾患の病勢や病型に反映していることが示唆されている。

例えば、①Mycobacterium 感染症においては、Mycobacterium に対する免疫反応がDTH (遅延型) 反応を主とした型をとっている場合はTh 1優位であり、慢性化し進行型を呈する場合にはTh 2優位になること、②HIV感染症においては、Th 1型のサイトカインの産生は長期間の非進行性患者に多く、Th 2への極性化が起こると症状は進行又は劇症化すること及び③アトピー性疾患の患者においては、Th 2への極性化が起こると症状が悪化すること等が現在明らかになりつつある。

そこで、本発明が解決すべき課題は、上記のTh 1/Th 2サブセットの分布の極性化 (以下、Th 1/Th 2インバランスという) における知見に基づいた、免疫関連疾患の病勢や病型の特定手段を提供することにある。

図面の簡単な説明

第1図は、B 1 9 クローンのノーザンブロッティング解析の結果を示す電気泳動写真像等を示した図面である。

第2図は、インビトロにおける本発明Th 2 (B 1 9) 遺伝子の翻訳産物の電気泳動写真像等を示した図面である。

第3図は、本発明Th 2 (B 1 9) 遺伝子由来のmRNA発現の組織特異性を示すノーザンブロッティング解析の結果を示す電気泳動写真像等を示した図面で

ある。

第4図は、本発明モノクローナル抗体を用いた膜蛍光抗体法により、T h 1 クローン及びT h 2 クローン細胞を染色後、フローサイトメーターで解析した結果を示した図面である。

発明の開示

本発明者は、上記課題について鋭意検討を行った。その結果、T h 2 に特異的なタンパク質とこれをコードする遺伝子及びT h 1 に特異的なタンパク質及びこれをコードする遺伝子をそれぞれ特定、調製することができれば、これを基にして所望する免疫関連疾患の病勢や病型の特定手段を提供し得ることを見出し本発明を完成した。

本願は、上記遺伝子の内、ヒトT h 2 に特異的なタンパク質及びこれをコードする遺伝子（B 1 9）に関連するものである。

すなわち、本発明者は本願において、以下に掲げる発明を提供するものである。

第1に、配列番号6で表されるアミノ酸配列のヒトT h 2 特異的タンパク質を提供する。

第2に、配列番号6で表されるアミノ酸配列の一部のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ請求項1記載のヒトT h 2 特異的タンパク質と実質的に同一の生物学的活性を有するヒトT h 2 特異的タンパク質を提供する。

第3に、配列番号6で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むヒトT h 2 特異的遺伝子を提供する。

第4に、配列番号5で表される塩基配列のヒトT h 2 特異的遺伝子を提供する。

第5に、配列番号5で表される塩基配列の一部の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつストリンジントな条件下で配列番号5で表される塩基配列のDNAとハイブリダイズし、さらに配列番号6で表されるアミノ酸配列を有するヒトT h 2 特異的タンパク質と実質的に同一の生物学的活性を有

するヒトTh2特異的タンパク質をコードするヒトTh2特異的遺伝子を提供する。

第6に、前記したいずれかのヒトTh2特異的遺伝子を含有する遺伝子発現用組換えベクターを提供する。

第7に、この遺伝子発現用組換えベクターで形質転換され、かつこの遺伝子発現用組換えベクターに含まれているヒトTh2特異的遺伝子が発現している形質転換体を提供する。

第8に、前記したヒトTh2特異的タンパク質のいずれかの部分を抗原決定基とし、かつヒトTh1特異的タンパク質との間においては免疫反応性を示さないモノクローナル抗体を提供する。

第9に、前記のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを提供する。

以下、本発明の実施の形態について説明する。

本発明におけるヒトTh2に特異的な遺伝子（以下、本発明Th2（B19）遺伝子という。この本発明Th2（B19）遺伝子には、特に断らない限り、本発明の技術的範囲に入るべき改変ヒトTh2（B19）特異的遺伝子（後述する）が含まれる。）の由来となるヒトTh2とは、上記の通り、ヒトヘルパーT細胞のサブセットの一つである。

このヒトTh2は、以下のような特徴を有するヘルパーT細胞のサブセットである。

①ヒトTh2は、IL-4及びIL-5を産生するが、IFN- γ 及びTNF- β は産生しない。

②ヒトTh2は、IL-2及びIL-4に反応して増殖し、IFN- γ の存在により誘導が抑制される（これに対して、他方のサブセットのヒトTh1は、同様にIL-2（IL-12にも）に反応して増殖するが、ヒトTh2とは逆に、IL-4の存在により誘導が抑制される）。

③ヒトTh2の表面マーカーは、現在ヒトTh1と明確に区別できる表面マーカーは見出されておらず、ヒトTh2はヒトTh1と同様に、CD44^{positive}、

CD 4 5 R B⁺, L E C A M - 1⁺の表現型を有する。

④ヒト T h 2 は、抗体産生を亢進させる。特に、I g E の産生を誘導する。

⑤ヒト T h 2 は、肥満細胞や好酸球の分化や増殖を促進する。

⑥ヒト T h 2 は、抗原特異的 D T H を誘起せず、慢性化し進行型を示す場合に優位となる。

本発明 (B 1 9) T h 2 遺伝子は、例えばこのような特徴を有するヒト T h 2 クローンを樹立し、このクローンからヒト T h 2 の c D N A ライブラリーを調製して得ることができる。

A. ヒト T h 2 クローンの樹立

所望するヒト T h 2 クローンを樹立する前提として、このクローンを含むことが知られている C D 4⁺ T 細胞集団を調製する。

この調製方法は、通常公知の方法、例えば "Gianfranco, F.D.P., et al., J. Clin. Invest., 88, 346(1991)" に記載されている方法に従って調製することが可能である。

より具体的には、例えばヒトの全血から末梢血単核球を分離して、これを種々の T 細胞活性化因子により刺激をして、所望する C D 4⁺ T 細胞集団を調製することができる。T 細胞活性化因子としては、例えばインゲンマメ由来の植物凝集素 (P H A) 等の非特異的 T 細胞活性化因子 ; I L - 2 , I L - 4 , I L - 1 2 等のサイトカイン ; P P D , ダニ抽出液等の刺激抗原等を挙げることができる。

この調製過程を経た後、後述する C D 4⁺ T 細胞の単離工程に先立ち、予め C D 4⁺ T 細胞以外の要素、例えば C D 8⁺ T 細胞等を除去する工程に付することが好ましい。この除去工程としては、例えば抗 C D 4 抗体を結合した磁気ビーズを用いて C D 4⁺ T 細胞のみを濃縮する方法等を挙げることができる。

上記誘導過程を経た後、C D 4⁺ T 細胞クローンを単離する。この単離方法も通常公知の方法、例えば限界希釈法に従ってこの単離を行うことができる。

より具体的には、例えば P H A 及び I L - 2 を添加した培地で、細胞をウェル当たり 0 . 5 ~ 1 0 細胞となるように 9 6 穴マイクロプレートに播き、3 ~ 4 日毎に I L - 2 添加培地で培地交換を続け、増殖が認められた (通常 2 ~ 4 週間) 細

胞について表面マーカーを調べ、CD 4 陽性のクローンのみを選択して、対象となるCD 4⁺ T細胞クローンとすることができる。

このようにして単離したCD 4⁺ T細胞クローンの中から所望のヒトTh 2クローンを選択・調製することができる。

CD 4⁺ T細胞クローンからのヒトTh 2クローンの選択は、既に知られているヒトTh 2とヒトTh 1の性質の違いに基づき行われる。

すなわち、例えば、抗CD 3抗体の刺激に应答してIL-4を産生するがIFN- γ を産生しないクローンをヒトTh 2クローンとして選択することができる（これに対して、逆にIFN- γ を産生するがIL-4を産生しないクローンはヒトTh 1として選択される）。

B. ヒトTh 2に特異的なcDNAの調製

ヒトTh 2のcDNAとヒトTh 1のcDNAには、双方に共通する遺伝子配列と、各々において特異的な遺伝子配列が存在することが予想される。

このような状況下、所望するヒトTh 2に特異的なcDNAを調製するには、ヒトTh 2のcDNA集団からヒトTh 1のcDNAと共通なものを除去する、いわゆるサブトラクション法を用いるのが有利である。

このサブトラクション法としては、例えばデービスらの方法（Davis, M. M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 2194(1984)）を挙げることができる。

この方法はサブトラクションの対象となる一方の素材のcDNAと、他方の素材の大過剰のpoly(A)⁺ RNAをハイブリダイズさせて、ハイブリダイズせずに残ったcDNAをプローブとして、上記一方の素材のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、上記一方の素材に特異的なcDNAクローンを得る方法である。

この方法は、大量のpoly(A)⁺ RNAを必要とするという点が、poly(A)⁺ RNAの素材を大量に入手することが困難な場合においては実施することが困難であるという欠点がある。

そこで、比較的少量のpoly(A)⁺ RNAを出発材料としてサブトラクションを行うために、PCR法を導入する方法も既に報告されている（例えば、ge

ne expression screen法 (Wang, Z. and Brown, D. D., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. , 88, 11505(1991)) 等]。この方法は、上記の方法における出発材料の cDNA を一度 PCR 法で増幅することを特徴とする方法であるが、上記サブトラクション操作と PCR による増幅操作を繰り返すことで希少な mRNA をクローニングできるという利点を有する方法である。

本発明においては、一般的に正常の CD4⁺ T 細胞クローンの大量培養が困難であり、cDNA の鑄型となる mRNA を大量に確保することが困難である故、上記のサブトラクション法のうち、例えば上記「gene expression screen法」を用いることが好ましい。

より具体的には、通常公知の方法 (例えば、poly(A)⁺ RNA を鑄型として、逆転写酵素を用いる方法) でヒト Th2 クローン及びヒト Th1 クローン由来の cDNA を調製して、PCR 法を用いてこれらの cDNA を増幅する。

この cDNA の増幅に際しては、PCR 法による増幅に適した長さの cDNA 断片を得るために、予め制限酵素処理や超音波処理を cDNA に施すことが好ましい。

また、PCR 法による増幅に必要な PCR プライマーとして、例えば、ヒト Th2 及びヒト Th1 それぞれに異なった塩基配列を有する特異的なプライマーを使用することができる。この特異的なプライマーは、通常化学合成により調製される。このようにすると、サブトラクション操作の後にヒト Th2 由来の cDNA のみが増幅され、微量に混入し得るヒト Th1 由来の cDNA の増幅を最小限に止め得るという点で有利である。

この場合は、予めこの PCR 用プライマーがアニールし得る配列を含んだリンカーを上記 cDNA 断片の両端に結合させる必要がある。このため、上記断片化処理においては、このリンカーが結合し得る末端を有する cDNA 断片を提供する制限酵素を用いることが好ましい。

PCR リンカーを結合した後のヒト Th2 クローン及びヒト Th1 クローン由来の cDNA 断片群より、ある程度の長さを有する断片をアガロースゲル電気泳動等の分別手段により選別し、この選別した cDNA 断片群を PCR 法により増幅し、この増幅済断片をサブトラクションの出発材料とすることができる。

このようにして調製したcDNA断片群のうち、ヒトTh2クローン由来のcDNA断片群から、ヒトTh2及びヒトTh1に共通する塩基配列を有するcDNAを除いたcDNA断片群を選別して、所望する本発明ヒトTh2遺伝子を含んだ遺伝子ライブラリーを調製することができる。

この選別方法は、例えば一定量のヒトTh2クローン由来のcDNA断片群に過剰量の標識したヒトTh1クローン由来cDNA断片群をハイブリダイズさせて、この標識に基づいてヒトTh1クローン由来cDNA断片とハイブリダイズしたcDNAを除去して、残りの断片をヒトTh2にのみ特異的な遺伝子配列に基づいたcDNA断片として扱う方法を採用することができる。

ここで用いる標識は、上記選別方法を行うことが可能である限り特に限定されないが、可能な限り標識及び除去が簡便な手段を用いることが好ましいことは勿論である。かかる点より、例えばビオチンでcDNA断片を標識して、標識されたcDNA断片をストレプトアビジンに吸着させる手法等を用いることが有利である。

なお、上記の手段により選別されたヒトTh2にのみ特異的な遺伝子配列に基づいたcDNA断片を、さらにPCR法によって増幅させて再び上記の選別手段を行う過程を繰り返すことによって、所望するcDNA断片を濃縮・増幅することができる。

このようにして調製した、cDNA断片を用いて、本発明Th2(B19)遺伝子を含んだ遺伝子ライブラリーを得ることができる。

かかる遺伝子ライブラリーの調製工程については、通常公知の方法を用いることができる。

すなわち、上記cDNA断片を適切な遺伝子導入用ベクターに組み込み、これを選択した遺伝子導入用ベクターに応じた宿主に導入することにより所望する遺伝子ライブラリーを調製することができる。なお、この遺伝子導入用ベクターにcDNA断片が組み込まれたか否かは、このベクターが保有する、例えばlacZ遺伝子活性によるカラーセクション等によって確認することができる。

ここで用いる導入用ベクターは、特に限定されず、例えばプラスミドとしては、pBluescript, pUC18, pBR322, pBGP120, pPCφ1, pP

C ϕ 2, pPC ϕ 3, pMC1403, pLG200, pLG300, pLG400等を; λ ファージとしては、 λ gt10, λ ZAPII等を挙げることができるが、取扱いの簡便さから上記lac Z遺伝子をマーカーとして保有するプラスミドを用いることが好ましい。具体的には、上記導入用ベクターのうち、pBluescript, pUC18, pBGP120等を選択することが好ましい。

なお、この遺伝子ライブラリーの調製工程を市販の遺伝子ライブラリー調製キットを用いて行うことも可能である。

C. 本発明Th2 (B19) 遺伝子の単離

上記のようにして調製した遺伝子ライブラリーから、直接DNAを抽出して、それらのうちのいくつかの塩基配列を決定して、それらの塩基配列から本発明Th2 (B19) 遺伝子を有するクローンを選別することも可能であるが、予めさらにクローンを選別して確実に本発明Th2 (B19) 遺伝子を有するクローンを特定することが好ましい。

かかる選別方法としては、通常公知の方法を用いることができる。たとえば、上記のごとく調製した、ヒトTh2に特異的な遺伝子に基づく遺伝子ライブラリー及び別に調製したヒトTh1に特異的な遺伝子に基づく遺伝子ライブラリーに由来する遺伝子を調製し、これに標識を施して標識プローブとして、ヒトTh2に特異的な遺伝子に基づく遺伝子ライブラリーのレプリカとハイブリダイズさせて、ヒトTh2に特異的な遺伝子のプローブとはハイブリダイズするが、ヒトTh1に特異的な遺伝子のプローブとはハイブリダイズしないクローンを選別して、このクローンを本発明ヒトTh2を保有するクローンとして、後述する本発明Th2 (B19) 遺伝子の塩基配列を決定する対象とすることができる。

なお、さらに慎重を期するために、例えばヒトTh2及びヒトTh1の全RNA又はpoly(A)⁺ RNAを用いたノーザンブロッティング法を用いて発現するmRNAのパターンを比較して、後述する本発明Th2 (B19) 遺伝子の塩基配列を決定する対象となるクローンを決定付けることもできる。

このようにして調製したクローンにおける本発明Th2 (B19) 遺伝子の塩基配列の決定手段は通常公知の方法を用いて行うことができる。

例えば、マキサムーギルバート法 (Maxam, A. M., and Gilbert, W., Proc. Natl. Ac

ad. Sci. U. S. A., 74, 560(1977)), ゲノミック・シーケンス法 (Church, G. M. and Gilbert, W., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81, 1991(1984)), マルチプレックス法 (Church, G. M. and Kieffer-Higgins, S., Science, 240, 185(1988)), サイクルシーケンス法 (Murray, V., Nucleic Acids Res., 17, 8889(1989)), ジデオキシ法 (Sanger, F., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 74, 5463(1977)) 等の方法を用いて、所望する本発明Th 2 (B 1 9) 遺伝子の塩基配列を決定することができる。

なお、これらの原理を応用した塩基配列自動解析装置を用いて、この塩基配列を決定することも勿論可能である。

上記のごとくして決定された本発明Th 2 (B 1 9) 遺伝子の塩基配列を基にして、この本発明Th 2 (B 1 9) 遺伝子そのものを入手することができる。

すなわち、上記と同様に調製した本発明Th 2 (B 1 9) 遺伝子の出所となるヒトTh 2のcDNAを鋳型とし、上記のごとく決定された本発明Th 2 (B 1 9) 遺伝子の5'末端側と3'末端側の配列を含むDNA断片をプライマーとして、前出のPCR法により、本発明Th 2 (B 1 9) 遺伝子を大量に増幅させて入手することができる。

また、上記のごとく塩基配列を決定したヒトTh 2 遺伝子断片そのものをプローブとして、ヒトTh 2から作出したcDNAの遺伝子ライブラリーから本発明Th 2 (B 1 9) 遺伝子を有するクローンを選別して、本発明Th 2 (B 1 9) 遺伝子の全長を入手する伝統的な手法を用いることも可能である。

さらに、ホスファイトートリエステル法 (Ikehara, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81, 5956(1984)) 等の通常公知の方法を用いて本発明Th 2 (B 1 9) 遺伝子を化学合成することも可能であり、これらの化学合成法を応用したDNAシンセサイザーを用いて本発明Th 2 (B 1 9) 遺伝子を合成することも可能である。

なお、このようにして製造する本発明Th 2 (B 1 9) 遺伝子の塩基配列の一部を改変して、この塩基配列の一部の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなる改変遺伝子 (この本発明Th 2 (B 1 9) 遺伝子 (B 1 9) に対する相同性は、概ね70%以上である) の存在を本発明者は認識し、このような改

変遺伝子にも本発明の技術的範囲は及ぶものである。

この本発明の技術的範囲が及び得るヒトTh2遺伝子は、ストリンジェントな条件下（系におけるDNA同士のハイブリッドが形成しにくい条件（具体的には、系の温度（高い程ハイブリッドしにくい）や塩濃度（低い程ハイブリッドしにくい）、やホルムアミド等の変性剤の濃度（高い程ハイブリッドしにくい）等に依存する）のことをいう。）で配列番号5（後述する）で表される塩基配列のDNAとハイブリダイズし、さらに配列番号6（後述する）で表されるアミノ酸配列を有するヒトTh2（B19）特異的タンパク質を実質的に同一の生物学的活性を有するヒトTh2特異的タンパク質をコードするヒトTh2特異的遺伝子である。

ここにいう「実質的に同一」とは、その生物学的活性が比較の対象となるヒトTh2（B19）特異的タンパク質の生物学的活性と質的及び／又は量的に同一性を有することを意味する。

具体的なヒトTh2（B19）特異的タンパク質の生物学的活性については後述する。

この遺伝子改変法として、通常公知の方法、例えばいわゆるサイトスペシフィックミュータジェネシス（Site-Specific Mutagenesis）（Mark, D.F., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81, 5662(1984)）等の方法を用いて、所望の遺伝子改変を行うことができる。

このようにして入手した本発明Th2（B19）遺伝子を用いて、疾患の局所におけるTh1／Th2バランスのチェックを行うことができる。

すなわち、疾患の局所のmRNAを抽出して、例えばRT-PCR法（“PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications” Innis, M.A., et al., ed., Academic Press, San Diego, 1990）を用いて、この組織における本発明Th2（B19）遺伝子の発現の程度を測定して、疾患の局所におけるTh1／Th2バランスのチェックを行うことができる。

このTh1／Th2バランスをチェックすることにより、上記従来技術の欄に記載したごとく、Th1／Th2インバランスが重大な要素となる疾患、例えばHIV感染症、アレルギー疾患、各種の感染症等の症状の推移等をより確実に把

握することができる。

なお、このTh 1/Th 2 バランスのチェックは、後述するヒトTh 2 のポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を用いて行うことも勿論可能であるが、ここに示したチェック手段は、これらの抗体を用いることが困難な局面、例えば目的のタンパク質の発現量が極微量である場合等に際して有効なチェック手段である。

D. 本発明ヒトTh 2 (B 1 9) タンパク質の製造：

さらに、このようにして入手した、本発明Th 2 (B 1 9) 遺伝子を用いて、組換えヒトTh 2 特異的タンパク質〔以下、本発明ヒトTh 2 (B 1 9) タンパク質という。この本発明ヒトTh 2 (B 1 9) タンパク質には、特に断らない限り上記の改変遺伝子から翻訳され得る改変タンパク質は、改変されていない本発明ヒトTh 2 (E 2 6) タンパク質と実質的に同一の生物学的活性を有する。〕を製造することができる。

この本発明ヒトTh 2 (B 1 9) タンパク質は、上記本発明Th 2 (B 1 9) 遺伝子を利用して、通常公知の一般的な遺伝子組換え技術に従って製造することができる。

より具体的には、本発明Th 2 (B 1 9) 遺伝子が発現可能な形態の遺伝子発現用ベクターに本発明Th 2 (B 1 9) 遺伝子を組み込み、この遺伝子発現用ベクターの性質に応じた宿主にこの組換えベクターを導入して形質転換し、この形質転換体を培養等することにより所望の本発明ヒトTh 2 (B 1 9) タンパク質を製造することができる。

ここで用いる遺伝子発現用ベクターは、通常発現しようとする遺伝子の上流域にプロモーター、エンハンサー、及び下流域に転写終了配列等を保有するものを用いるのが好適である。

また、本発明Th 2 (B 1 9) 遺伝子の発現は、直接発現系に限らず、例えばβ-ガラクトシダーゼ遺伝子、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ遺伝子やチオレドキシン遺伝子を利用した融合タンパク質発現系とすることもできる。

かかる遺伝子発現用ベクターとしては、例えば宿主を大腸菌とするものとして

は、pQE, pGEX, pT7-7, pMAL, pTrxFus, pET, pNT26CII等を例示することができる。また、宿主を枯草菌とするものとしては、pPL608, pNC3, pSM23, pKH80等を例示することができる。

また、宿主を酵母とするものとしては、pGT5, pDB248X, pART1, pREP1, YEpl3, YRp7, YCp50等を例示することができる。

また、宿主を哺乳動物細胞又は昆虫細胞とするものとしては、p91023, pCDM8, pcDL-SR α 296, pBCMGSNeo, pSV2dhfr, pSVdhfr, pAc373, pAcYM1, pRc/CMV, pREP4, pcDNAI等を例示することができる。

これらの遺伝子発現ベクターは、本発明ヒトTh2(B19)タンパク質を発現させる目的に応じて選択することができる。例えば大量に本発明ヒトTh2(B19)タンパク質を発現させることを企図する場合には、宿主として大腸菌、枯草菌又は酵母等を選択し得る遺伝子発現ベクターを選択するのが好ましく、少量でも確実に活性を有するように本発明ヒトTh2(B19)タンパク質を発現させることを企図する場合には、哺乳動物細胞や昆虫細胞を宿主として選択し得る遺伝子発現ベクターを選択するのが好ましい。

上記のように既存の遺伝子発現ベクターを選択することも可能であるが、目的に応じて適宜遺伝子発現ベクターを作出して、これを用いることも勿論可能である。

なお、これらの遺伝子発現用組換えベクターも本発明の技術的範囲に入るものである。

本発明Th2(B19)遺伝子を組み込んだ上記遺伝子発現用ベクターの宿主細胞への導入及びこれによる形質転換法は、一般的な方法、例えば宿主細胞が大腸菌や枯草菌である場合には、塩化カルシウム法やエレクトロポレーション法等を；宿主が哺乳動物細胞や昆虫細胞の場合はリン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法又はリボソーム法等の手段により行うことができる。

このようにして得られる形質転換体を常法に従い培養することにより、所望す

る本発明ヒトTh2 (B19) タンパク質が蓄積される (このような形質転換体も本発明の技術的範囲に含まれる)。

かかる培養に用いられる培地は、宿主の性質に応じて適宜選択することができるが、例えば宿主が大腸菌である場合には、LB培地やTB培地等が、宿主が哺乳動物細胞の場合には、RPMI 1640培地等を適宜用いることができる。

この培養により得られる培養物からの本発明ヒトTh2 (B19) タンパク質の単離及び精製は、常法に従い行うことが可能であり、例えば培養物を、本発明ヒトTh2 (B19) タンパク質の物理的及び/又は化学的性質を利用した各種の処理操作を用いて行うことが可能である。

具体的には、タンパク沈殿剤による処理、限外濾過、ゲル濾過、高速液体クロマトグラフィー、遠心分離、電気泳動、特異抗体を用いたアフィニティクロマトグラフィー、透析法等を単独で又はこれらの方法を組み合わせて用いることができる。

このようにして、本発明ヒトTh2 (B19) タンパク質を単離、精製することが可能である。

なお、上記の本発明Th2 (B19) 遺伝子発現系において、宿主として患者自身から分離したT細胞又は骨髓細胞等を本発明Th2 (B19) 遺伝子で形質転換して、この形質転換体を患者に戻すことにより、いわゆる遺伝子治療に利用することが可能である。

この場合の発現用ベクターとしては、例えばレトロウイルスやアデノウイルス等のウイルスベクター等を挙げることができる。

この形質転換細胞を用いて行う遺伝子治療は、Th1優位のTh1/Th2インバランスに陥っていることが重大な原因となる疾病の患者に対して行うことができる。具体的には、例えば多発性硬化症やリウマチ様関節炎に上記形質転換細胞を投与して、これによりこれらの疾患の重大な原因となっているTh1優位のTh1/Th2インバランスを、投与した形質転換細胞にヒトTh2 (B19) タンパク質を患者の体内で発現させることにより遺伝子治療を行うことができる。

E. 本発明ヒトTh2 (B19) タンパク質に対する抗体の製造:

本発明は、上記本発明ヒトTh2 (B19) タンパク質に対する抗体にも関する。

すなわち、本発明ポリクローナル抗体は、ヒトTh2 (B19) タンパク質を免疫抗原として免疫した動物に由来する免疫血清から製造することができる。

ここで使用される免疫抗原としてのヒトTh2 (B19) タンパク質は、特に限定されるものではなく、上記のごとく調製される本発明Th2 (B19) 遺伝子(その塩基配列の一部を改変したものも含む)がコードする本発明ヒトTh2 (B19) タンパク質を用い得ることは勿論のこと、本発明Th2 (B19) 遺伝子の一部断片がコードする本発明ヒトTh2 (B19) タンパク質の断片や本発明ヒトTh2 (B19) タンパク質に直接酵素処理等を施して、又は化学合成して得られる本発明ヒトTh2 (B19) タンパク質の部分ペプチドをも本発明ポリクローナル抗体を製造する上での免疫抗原とすることができる。

また、免疫動物と同種・同系統の動物由来の細胞株を、ヒトTh2 タンパク質(本発明ヒトTh2 (B19) タンパク質を含む)又はその一部をコードする遺伝子を組み込んだ発現ベクターを導入して形質転換して、この形質転換細胞をその免疫動物に移植することにより本発明ポリクローナル抗体を調製することができる。すなわち、形質転換細胞を移植した動物の体内で、持続的に上記ヒトTh2 タンパク質がその形質転換細胞で作られ、それに対する抗体が産生されて、これを本発明ポリクローナル抗体とすることもできる(Nemoto, T., et al., Eur. J. Immunol., 25, 3001(1995))。

さらに、上記ヒトTh2 タンパク質を発現する発現ベクターを直接動物に筋注や皮下注等の手段で投与することにより、その動物内で上記ヒトTh2 タンパク質を継続的に産生させて、上記の形質転換細胞を移植した場合と同様に本発明ポリクローナル抗体を製造することができる(Raz, E., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 91, 9519(1994))。

一方、本発明モノクローナル抗体は、本発明ポリクローナル抗体の場合と同様の方法で、免疫した動物の免疫細胞と動物の骨髓腫細胞とのハイブリドーマを作出し、これによりヒトTh2 タンパク質を認識する抗体を産生するクローンを選

択し、このクローンを培養することにより製造することができる。

また、免疫される動物も特に限定されるものではなく、マウス、ラット等を広く用いることができるが、モノクローナル抗体を製造する場合には、細胞融合に用いる骨髓腫細胞との適合性を考慮して選択することが望ましい。

免疫は一般的方法により、例えば上記免疫抗原を免疫の対象とする動物に静脈内、皮内、皮下、腹腔内注射等で投与することにより行うことができる。

より具体的には、上記免疫抗原を所望により通常のアジュバントと併用して、免疫の対象とする動物に2～14日毎に上記手段により数回投与し、ポリクローナル抗体製造のための免疫血清又はモノクローナル抗体製造のための免疫細胞、例えば免疫後の脾臓細胞を得ることができる。

モノクローナル抗体を製造する場合、この免疫細胞と細胞融合する他方の親細胞としての骨髓腫細胞としては、既に公知のもの、例えばSP2/0-Ag14、P3-NS1-1-Ag4-1、MPC11-45、6、TG1.7（以上、マウス由来）；210、RCY、Ag1.2、3（ラット由来）；SKO-007、GM15006TG-A12（以上、ヒト由来）等を用いることができる。

上記免疫細胞とこの骨髓腫細胞との細胞融合は、通常公知の方法、例えばケーラーとミルシュタインの方法（Kohler, G. and Milstein, C., *Nature*, 256, 495 (1975)）等に準じて行うことができる。

より具体的には、この細胞融合は、通常公知の融合促進剤、例えばポリエチレングリコール（PEG）、センダイウイルス（HVJ）等の存在下において、融合効率を向上させるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を必要に応じて添加した通常の培養培地中で行い、ハイブリドーマを調製する。

所望のハイブリドーマの分離は、通常の選別用培地、例えばHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジン）培地で培養することにより行うことができる。すなわち、この選別用培地において目的とするハイブリドーマ以外の細胞が死滅するのに十分な時間をかけて培養することによりハイブリドーマの分離を行うことができる。このようにして得られるハイブリドーマは、通常の限界希釈法により目的とするモノクローナル抗体の検索及び単一クローン化に供することができる（このハイブリドーマも本発明の技術的範囲に入るものである。）。

目的とするモノクローナル抗体産生株の検索は、例えばELISA法、ブラーク法、スポット法、凝集反応法、オクタロニー法、RIA法等の一般的な検索法に従い行うことができる。

このようにして得られるヒトTh2タンパク質を認識する所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培地で継代培養することが可能であり、さらに液体窒素中で長時間保存することもできる。

このハイブリドーマからの所望のモノクローナル抗体の採取は、このハイブリドーマを常法に従って培養して、その培養上清として得る方法や、ハイブリドーマをこのハイブリドーマに適合性が認められる動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法等を用いることができる。

なお、インビトロで免疫細胞をヒトTh2タンパク質又はその一部の存在下で培養し、一定期間後に上記細胞融合手段を用いて、この免疫細胞と骨髓腫細胞とのハイブリドーマを調製し、抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングすることで所望するモノクローナル抗体を得ることもできる(Reading, C.L., J. Immunol. Meth., 53, 261(1982); Pardue, R.L., et al., J. Cell Biol., 96, 1149(1983))。

さらに、免疫原として本発明ヒトTh2(B19)タンパク質を用いることなしに、免疫原として直接本発明Th2(B19)遺伝子又はその一部を用いて所望するモノクローナル抗体を得ることも可能である。

すなわち、本発明Th2(B19)遺伝子で直接動物を免疫して(この免疫の際には、この遺伝子を含む遺伝子発現用組換えベクターを免疫原として用いることができる)、その遺伝子免疫動物の免疫細胞又は免疫血清を用いることによって、ヒトTh2(B19)タンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体を製造することができる。

また、上記で得られるポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体は、更に塩析、ゲル濾過法、アフィニティクロマトグラフィー等の通常的手段により精製することができる。

このようにして得られるポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体は、ヒトTh2タンパク質に対して特異反応性を有する抗体である。

上記ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体は、体内のTh1/Th2バ

ランスをチェックする手段として用いることができる。すなわち、上記抗体をE L I S A, R I A, 免疫組織化学的手法, フローサイトメトリーによる解析, ウェスタンブロット法等に用いることによって、検体中のヒトT h 2量を特定することにより、体内のT h 1/T h 2バランスをチェックして、上記従来技術の欄に記載したごとく、T h 1/T h 2インバランスが重大な要素となる疾患、例えばアトピー性疾患やエイズ等の症状の推移等をより確実に把握することができる。

また、上記のようにして得られるポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体は、例えばT h 2が優位のT h 1/T h 2インバランスを是正する抗体として用いることができる。

なお、動物由来の抗体においては、そのまま人間に投与する場合に抗原性が認められ、そのままヒトに投与するのには適さない面がある。そのために、動物由来のモノクローナル抗体の遺伝子の可変領域をクローニングして、この可変領域の遺伝子とヒト型の抗体の遺伝子の定常領域の遺伝子と結合させて、この融合遺伝子を発現させて融合抗体を製造することができる(Clackson, T., et al., Nature, 352, 624(1991))。

この技術を上記モノクローナル抗体について適用することも可能である。すなわち、動物由来の上記モノクローナル抗体の可変領域とヒト型の抗体の定常領域とが融合した融合抗体を、例えばT h 2が優位のT h 1/T h 2インバランスを是正する抗体として用いることもできる。

実施例

以下、実施例等により本発明を具体的に記載するが、この実施例により本発明の技術的範囲が限定して解釈されるべきものではない。

〔実施例1〕 本発明T h 2 (B 1 9) 遺伝子の製造等

(1) ヘルパーT細胞クローンの調製

健常人の末梢血単核球(P B M C) 10^6 細胞/mlに、ヒトT h 1細胞を主に誘導するために、P H A (E Yラボラトリーズ社製) $1\mu\text{g/ml}$, r I F N- γ (ジエンザイム社製) 50ng/ml 及びr I L-12 (R & Dシステムズ社製) 5ng

/ml を添加して5日間培養した。一方、ヒトTh2を主に誘導するために、PBMCにダニ抽出液（鳥居薬品製）2%（v/v）、rIL-4（ジェンザイム社製）20ng/ml 及び抗IFN- γ 抗体（ジェンザイム社製）を5 μ g/mlを添加して5日間培養した。

5日後、各々の培養にrIL-2（塩野義製薬製）を40U/ml 添加して、さらに7～10日間培養した。

次に、この培養集団の中から、CD4⁺T細胞を分離するために、抗CD4抗体を結合した磁気ビーズ（ダイナル社製）を吸着させた後、磁石上でビーズと結合した細胞を回収した。次に、磁気ビーズ分離用試薬（ダイナル社製）で、磁気ビーズからCD4⁺T細胞を解離させ、CD4⁺T細胞を得た。

次いで、この純化したCD4⁺T細胞集団をPHA0.5 μ g/ml及びrIL-2を40U/ml添加した、15%牛胎児血清添加RPMI1640で、細胞をウエル当たり0.5細胞となるように96穴マイクロプレートに播き、3～4日毎に上記と同様のIL-2添加培地で培地交換を続け、増殖が認められた細胞について表面マーカーを蛍光抗体法を用いて調べ、CD4に対して陽性のクローンのみを選択して、対象となるCD4⁺T細胞クローンとした（Gianfranco, F.D.P., et al., J. Clin. Invest., 88, 346(1991)）。

次に、個々のCD4⁺T細胞クローンの細胞のタイプを調べるために、上記CD4⁺T細胞クローン（ 6×10^5 cells/300 μ l/ウエル）を、抗CD3抗体（OKT3：オーソファーマスーティカル社製）をコートした48ウエルプレートで24時間培養し、その培養上清中のIFN- γ 及びIL-4の濃度をそれぞれのモノクローナル抗体を用いたELISAで測定した。

その結果、IL-4を産生するがIFN- γ を産生しないものをヒトTh2クローンとした。その結果を第1表に示す。

第 1 表

クローン	ドナー	一次刺激	サイトカイン産生 (ng/ml) ^{a)}		Th タイプ
			IFN- γ	IL-4	
1P04	KN	PHA	> 50.0	< 0.2	Th1
2P15	KT	PHA	19.2	< 0.2	Th1
2P26	KT	PHA	< 0.5	9.0	Th2
KND4	KN	Der ^{b)}	< 0.5	4.9	Th2

a) 細胞 (6×10^5 cells/300 μ l/well) を OKT3 を固相化した 48 穴プレート中で 24 時間培養後、上清中の IFN- γ と IL-4 の濃度を ELISA により測定した。

b) ダニ抽出液

(2) サブトラクト cDNA ライブラリーの調製

上記 (1) において得たヒト Th2 クローン (2P26) 及びヒト Th1 クローン (2P15) よりそれぞれ poly (A) + RNA をオリゴ dT ラテックス (日本ロシュ製) を用いて常法により調製した。次いで、これらの poly (A) + RNA を鋳型にして、オリゴ (dT) プライマー (ファルマシア製) 及び MLV 逆転写酵素 (ファルマシア製) を用いて、それぞれの cDNA を約 300 ng を調製した。次に、それぞれの cDNA を、PCR 法による増幅工程に処するに適した鎖長にするために、制限酵素 A1u I (東洋紡績製) 84 U 及び同 Rsa I (東洋紡績製) 48 U で、37°C で 5 時間消化し、それぞれに異なる PCR 用のリンカー (Balzer, H. J., and Baumlein, H., Nucleic Acids Res., 22, 2853 (1994)) :

ヒト Th2 用リンカー :

5' - AGT TAC ACG TCT AGA ATG GCT - 3'

(配列番号 1)

3' - ATAG TCA ATG TGC AGA TCT TAC CGA
- 5' (配列番号2)

ヒトTh1用リンカー:

5' - CTC TTG CTT GAA TTC GGA CTA - 3'
(配列番号3)

3' - ACAC GAG AAC GAA CTT AAG CCT GAT
- 5' (配列番号4)

を結合した後に、アガロース電気泳動により分子量が0.2Kbpから2KbpのcDNA断片のみを分取した。次に、このようにして得られた2P26由来及び2P15由来のcDNA断片を、それぞれ特有のPCR用プライマー:

ヒトTh2用プライマー:

5' - AGT TAC ACG TCT AGA ATG GCT - 3'
(配列番号1)

ヒトTh1用プライマー:

5' - CTC TTG CTT GAA TTC GGA CTA - 3'
(配列番号3)

を用いてPCRにより増幅した(熱サイクル: 94°C1分; 50°C1分; 72°C2分; を30回)。このPCRにより得られたPCR産物をサブトラクションの出発材料とした。

すなわち、ヒトTh2(2P26)由来の上記PCR産物(5 μ g)に大過剰量のビオチン標識ヒトTh1(2P15)由来のPCR産物(100 μ g)〔DNA(100 μ g)に光反応性ビオチン(100 μ g) (ベクターラボラトリーズ社製)を加え、水中で冷しながら、160Wサンランプ下約15cmの所に静置し、15分間照射した。その後、未反応ビオチンをブタノール抽出で除去し、この操作を再度繰り返した後、トリス・EDTA緩衝液(TE)に溶解してビオチン標

識を完了した。)を加え、100℃で熱変性してそれぞれを1本鎖とした後に両者をハイブリダイズさせた。次いで、フリーの2P15由来のcDNA及び2P26由来のcDNAとハイブリダイズした2P15由来のcDNAを、系にストレプトアビジン(ライフテクノロジーズ製)を100μg添加して、これに吸着させて、フェノール・クロロホルム抽出により除去した。この操作により、2P26由来のcDNAから2P15由来のcDNAと共通の塩基配列を持つcDNAが差し引かれ、2P26に対して特異的なcDNAを濃縮するサブトラクションが完了した。

次いで、この濃縮した2P26に対して特異的なcDNAについて、上記のPCR増幅及びサブトラクションを再度繰り返し、2P26に対して特異的なcDNAをさらに濃縮した後、再度上記と同様のPCR増幅を行い、約3μgのcDNAを得た。

このようにして得た2P26に対して特異的なcDNAを、プラスミドpBlue script SK(-)(ストラタジーン社製)にクローニングしてサブトラクトcDNAライブラリーを調製した。次いで、このサブトラクトcDNAライブラリーの一部で大腸菌(E. coli JM109株)を形質転換した。

(3) 本発明Th2(B19)遺伝子断片の単離

上記(2)で得た2P26由来のサブトラクトcDNA及び同様の方法により得られた2P15由来のサブトラクトcDNAを、それぞれランダムプライミング法を用いた市販の³²P標識用キット(宝酒造製)を用いて標識し、これらを放射性プローブとした。

一方、上記(2)において調製した2P26由来のcDNAライブラリーの一部で形質転換した大腸菌をプレートに播き、生育してきたコロニーについて2組のレプリカフィルターを作製した。この2組のレプリカフィルターに対して、上述の2種の放射性プローブをハイブリダイズさせ、0.1×SSCで洗浄後、オートラジオグラフィーでプローブ中のcDNAと相同なcDNAを含む大腸菌コロニーを同定した。

この方法で、約3400のコロニーをスクリーニングした結果、「2P15由

来のサブトラクトcDNAプローブでは陽性シグナルを与えず、2P26由来のサブトラクトcDNAプローブに対してのみ陽性シグナルを与える」コロニーを201個認めた。この201個のcDNAクローンについて、コロニーハイブリダイゼーション法により、相互の異同を検討した結果、相互にハイブリダイズしない独立した60個のクローンを得た。

次に、この60個のクローンについて、全RNAを用いたノーザンブロッティングにより、2P26と2P15との間でのmRNAの発現の差を検討した。

その結果、2P15には殆ど発現しておらず、2P26にのみ発現が顕著であるクローンを13種得た。

次に、この13種のクローンのcDNAについて、さらにヒトTh2に対する特異性を確認するために、複数のヒトTh2クローン細胞及びヒトTh1クローン細胞との間でのmRNAの発現の差を、上記ノーザンブロッティング法により検討した。その結果、ヒトTh2クローン細胞にのみ共通に発現が認められるいくつかのcDNAクローンを得た。そのうちの1つのクローン(B19)の上記ノーザンブロッティング解析の結果を第1図に示す。

この第1図において、B19 mRNAが上記2つのヒトTh2クローン(2P26及びKND4)において発現していることが明らかになった(レーン3及びレーン4に対応する)。

なお、B19 mRNAはヒトTh1クローン(1PO4及び2P15:それぞれレーン1及びレーン2に対応する)には発現していなかった。

cDNAクローンB19のDNAの塩基配列の解析を、蛍光ターミネーターを用いたジデオキシターミネーション法により(パーキンエルマーシートス社のキットを用いた)行った。

その結果、クローンB19は、新規の塩基配列を有するDNAを有していた。

そこで、次にクローンB19が有する上記遺伝子と相同の塩基配列を含む遺伝子〔本発明Th2(B19)遺伝子〕の全長についてのクローニングを行った。

(4) 本発明Th2(B19)遺伝子のクローニング

所望のcDNAの全長をクローニングするために、B19 mRNAの発現が高

い細胞からλファージcDNAライブラリーを調製した。

すなわち、上記2P26細胞より全RNAを抽出し、オリゴ(dT)ラテックス(日本ロシュ製)を用いて、poly(A)⁺RNAを常法により精製した。次に、市販のcDNAクローニングキット(ライフテクノロジー社製)を用いて、2本鎖cDNAを合成し、λZAPII(ストラタジーン社製)のEcoRIサイトにクローニングした。これに引続き、市販のキット(ストラタジーン社製)を用いて、インビトロで上記λファージにおけるパッケージングを完了した。このパッケージング産物を大腸菌XL1-Blue MRF'(ストラタジーン社製)に感染させ、約 1×10^5 個の組換えλファージを得た。次に、上記(3)により得た新規のcDNA断片をランダムプライミング法を用いた市販の³²P標識用キット(宝酒造製)を用いて標識し、これを放射性プローブとして、ブラークハイブリダイゼーション法によりλファージライブラリーのスクリーニングを行った。

その結果、42の陽性クローンを見出し、これらの陽性cDNAクローンのうち、最も長いインサートDNAを持つクローン3個について、上記(3)と同様の蛍光ターミネーターを用いたジデオキシターミネーション法による塩基配列解析の結果、3つの陽性クローンのcDNAの互いに重複する部分の塩基配列は完全に一致しており、同一の遺伝子に由来するクローンであることが確認された。

これらの3つの陽性クローンのうち、最も長いcDNAを有するクローンB19-1をB19と称し、以下に用いた。

(5) 本発明Th2(B19)遺伝子の構造

クローンB19に取り込まれたcDNAは2911bpの鎖長であり、ノーザンブロットィングで測定されたmRNAの長さ(約3kbp)に近いものであった。そして、その3'端に、poly(A)⁺付加シグナル及びpoly(A)⁺の一部と思われる10個のA(アデニン)を有していた。

また、最も長いオープンリーディングフレームは、5'端より113番目のATGより始まり、1298番目のTGAで終わり、395アミノ酸残基よりなるタンパク質をコードしていると予測された。その開始コドン付近の塩基配列(C

CC ACG ATGT)は、Kozakのコンセンサス配列(CCA(G)C
CATGG: Kozak, M., Nucleic Acids Res., 15, 8125(1987))と類似していた。

以上の点より、クローンB19は、mRNAの3'端から始まり、コーディング領域全長を経て5'側の非翻訳領域の一部に達するほぼ全長を含んでいると判断された。

このクローンB19の有するcDNA配列を有する遺伝子を本発明Th2(B19)遺伝子とし、その配列を配列番号5に示す。また、この塩基配列がコードすると推定されるアミノ酸配列を配列番号6に示す。

なお、このアミノ酸配列を一文字法で表すと以下ようになる。

『MSANATLKPLCPILEQMSRLQSHSNTSIRYIDHAAVLLHGLASLLGLVENGVILFVVGCRMRQT
VVTTWVLHLALSDLLASASLPFFTYFLAVGHSWELGTTFCCLHSSIFFLNMFASGFLLSAISLD
RCLQVVRPVWAQNHRTVAAAHKVCLVLWALAVLNTVPYFVFRDTISRLDGRIMCYYNVLLLNP
PDRDATCNSRQAALAVSKFLLAFLVPLAI IASSHAAVSLRLQHRGRRRPGRFVRLVAAVVAFA
LCWGPYHVFSLLBARAHANPGLRPLVWRGLPFVTSLAFFNSVANPVLVLTCPDMLRKLRRSLR
TVLESVLVDDSELGGAGSSRRRTSSTARASPLALCSRPEEPRGPARLLGWLLGSCAASPQTG
PLNRALSSTSS』

〔上記アミノ酸配列において、A：アラニン，V：バリン，L：ロイシン，I：イソロイシン，P：プロリン，F：フェニルアラニン，W：トリプトファン，M：メチオニン，G：グリシン，S：セリン，T：トレオニン，C：システイン，Q：グルタミン，N：アスパラギン，Y：チロシン，K：リシン，R：アルギニン，H：ヒスチジン，D：アスパラギン酸，E：グルタミン酸，をそれぞれ示す。〕

また、本発明遺伝子を大腸菌(E. coli K12-JM109株)に組み込んだ形質転換体が、B19 cDNAとして、工業技術院生命工学工業技術研究所(〒305日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に受託番号FERM P-15616(1996年5月15日付受託)で寄託されている。

(6) インビトロにおける本発明Th2 (B19) 遺伝子の転写及び翻訳
市販のキット (ストラタジーン社製) を用いて、本発明Th2 (B19) 遺伝子を鋳型として、T7 RNAポリメラーゼを用いてRNAを合成した。続いて³⁵Sメチオニンの存在下に、市販のウサギ網状赤血球抽出物 (プロメガ バイオテック社製) を用いてインビトロ翻訳を行った。

次いで、その翻訳産物をレムリ (Laemmli) の方法に従い、SDSポリアクリルアミド電気泳動で分析した。その結果、予測された分子量である43Kdと近似した分子量を有するタンパク質が作られていることを確認した (第2図)。

(7) mRNA発現の組織特異性

本発明Th2 (B19) 遺伝子由来のmRNA発現の組織特異性を調べるために、種々の組織に由来する細胞株の全RNAについてのノーザンブロッティング解析を行った。

その結果、用いたいずれの細胞株でも本発明Th2 (B19) 遺伝子由来のmRNAの発現が確認できなかった (第3図)。

従って、本発明Th2 (B19) 遺伝子の発現は、Th2細胞を含む特定の細胞に限定されることが明らかになった。

〔実施例2〕本発明ヒトTh2 (B19) タンパク質を抗原とする抗体の製造

(1) 本発明Th2 (B19) 遺伝子発現ベクターの調製

哺乳動物細胞での導入遺伝子の発現レベルは用いる宿主細胞と発現ベクターの組み合わせにより大きく違って来る傾向が強いので予め予測することが困難である。そこで高発現が期待される幾つかの発現ベクターに本発明Th2 (B19) 遺伝子を組み込んだ。

すなわち、本発明Th2 (B19) 遺伝子の全長 (配列番号5) を含むプラスミドDNA (pBluescript SK(-), cDNAクローンB19) から本発明Th2 (B19) 遺伝子のコード領域を含むインサートDNAを、目的の発現プラスミドのクローニングサイトに合わせた制限酵素により切り出し、アガロース電気泳動

で精製した。

このようにして得た本発明Th2 (B19) 遺伝子をpRc/CMV、pcDL-SR α 、pREP9等の各クローニングサイトに挿入し、所望する本発明Th2 (B19) 遺伝子の哺乳動物細胞用の発現ベクター（プラスミド）を多種類得た。

(2) 本発明Th2 (B19) 遺伝子発現形質転換細胞の調製とこの細胞による免疫

(1) において得たそれぞれの本発明ヒトTh2 (B19) タンパク質発現プラスミド50 μ g をエレクトロポレーション法によりJurkat細胞、293細胞（以上ヒトT細胞株及び腎細胞株）、BW5147（マウスT細胞株）及びTART-1（ラットT細胞株）、それぞれ 10^7 個の細胞に導入した。

形質転換細胞は96ウエルプレートにウエルあたり500～1000個の細胞を播き、ゲネチシン（シグマ社製）を含む培地中で2～3週間培養し選択した。なお、本発明Th2 (B19) 遺伝子の発現のレベルはノーザンブロッティング法により確認した。

多数の形質転換細胞のうち、各細胞株ごとに本発明Th2 (B19) 遺伝子の発現レベルの最も高かった細胞を選び、96ウエルプレートにウエルあたり0.3細胞の割合で播くクローニング操作を行った。

この結果、本発明Th2 (B19) 遺伝子を安定に、高レベルで発現している細胞株である、Jurkat/B19、293/B19、BW/B19及びTART/B19を得た。

このようにして得た本発明Th2 (B19) 遺伝子の形質転換細胞のうち、TART/B19細胞 10^7 個を8週齢ウィスターラット（雌）の腹腔に週に一度、計5回免疫した（Nemoto, T., Eur. J. Immunol., 25, 3001 (1995)）。

(3) ハイブリドーマの調製

最終免疫の3日後のラットの脾臓細胞 3×10^8 個をマウスミエローマ細胞株

SP2/0-Ag14の 5×10^7 個と混和し、50%ポリエチレングリコール（平均分子量1500）PBS溶液（シグマ社製）を用いて細胞融合を行った。処理後の細胞を96ウェルプレートにウェルあたり 1×10^5 個で播き、翌日よりHAT試薬（シグマ社製）を添加し、10日間選択培養を行ったところ、ほぼ全ウェルにハイブリドーマの増殖が認められた。

各ハイブリドーマの培養上清中の本発明ヒトTh2（B19）タンパク質に対して特異的なモノクローナル抗体の存在の有無はTART-1細胞とTART/B19細胞を用いた膜蛍光抗体法で確認した。

すなわち、TART-1細胞およびTART/B19細胞それぞれ 5×10^5 個にハイブリドーマの培養上清50 μ lを加え、よく混和後、室温で20分反応させた。0.5%BSAを含むPBSで2回洗浄後、細胞をフィコエリスリン標識ヤギ抗ラットイムノグロブリン抗体（Bio source International社製）中で室温で20分間反応させた。反応後、再び0.5%BSA添加PBSで2回洗浄後、細胞を少量の50%グリセリン/PBS中に浮遊させ、スライドガラスとカバーガラス間に封じ、蛍光顕微鏡（オリンパス社製）下で細胞膜上の蛍光の強度を観察した。

その結果、TART-1細胞膜には蛍光が認められず、TART/B19細胞膜に対してのみ反応性が認められるものを陽性サンプルと判定した。

（4）モノクローナル抗体の調製

上記スクリーニング法で陽性であったハイブリドーマ培養上清については、さらに上述した複数の細胞パネルで本発明ヒトTh2（B19）タンパク質に対する特異性を確認した。

すなわち、JurkatとJurkat/B19、293と293/B19、及びBW5147とBW/B19について、上述したと同様の膜蛍光抗体法で反応の特異性を確認した。

このようにして全ての細胞パネルにおいて特異性が確認されたハイブリドーマ細胞について、96ウェルプレートにウェルあたり0.3細胞を播くクローニング操作を2～3回繰り返し、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを確立した

。

これらのハイブリドーマのうちの1つが、Rat Hybridoma BM 16として、工業技術院生命工学工業技術研究所（〒305日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に受託番号FERM P-16216（1997年5月8日付受託）で寄託されている。

このハイブリドーマ（Rat Hybridoma BM16）を用いて、上述したと同様の膜蛍光抗体法でTh1クローン細胞、及びTh2クローン細胞を染色し、フローサイトメーターで解析した結果を第4図に示す。

第4図において、本発明Th2（B19）遺伝子産物は膜に発現しており、Th1に比べてTh2細胞に優勢に発現していることが確認された。

産業上の利用可能性

本発明により、上記のTh1/Th2サブセットの分布における極性化における知見に基づいた、免疫関連疾患の病勢や病型の特定手段の重要な要素となるヒトTh2特異的遺伝子及びヒトTh2特異的タンパク質が提供される。

また、本発明によりこのヒトTh2特異的遺伝子を含む遺伝子発現用組換えベクター、及びこの遺伝子発現用組換えベクターで形質転換された形質転換体が提供される。

さらに、本発明により上記ヒトTh2特異的タンパク質を抗原とするモノクローナル抗体及びこのモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが提供される。

。

配列表

配列番号：1

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGTTACACGT CTAGAATGGC T

21

配列番号 : 2

配列の長さ : 2 5

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

AGCCATTCTA GACGTGTAA CTGATA

25

配列番号 : 3

配列の長さ : 2 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CTCTTGCTTG AATTCGGACT A

21

配列番号 : 4

配列の長さ : 2 5

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TAGTCCGAAT TCAAGCAAG AGCACA

25

配列番号 : 5

配列の長さ : 8 6 2

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 両形態

トポロジー : 不明

配列の種類 : cDNA

起源

ヒトTh2 (B19) 遺伝子

配列

```
CAGCCTCCCT CTCCCACCTC TGTCTGCCCG CTGCCTCTTG TCTAGCTGCT GTCAGGAGCT 60
GACTGCCTCC AGGGCTGGAA TCCTGTGCTC CCTCTGTGCC CAGAGCCCCA CGATGTCCGC 120
CAACGCCACA CTGAAGCCAC TCTGCCCCAT CCTGGAGCAG ATGAGCCGTC TCCAGAGCCA 180
CAGCAACACC AGCATCCGCT ACATCGACCA CGCGGCCGTG CTGCTGCACG GGCTGGCCTC 240
GCTGCTGGGC CTGGTGGAGA ATGGAGTCAT CCTCTTCGTG GTGGGCTGCC GCATGCCCCA 300
GACCGTGGTC ACCACCTGGG TGCTGCACCT GGCCTGTGCC GACCTGTTGG CCTCTGCTTC 360
CCTGCCCTTC TTCACCTACT TCTTGGCCGT GGGCCACTCG TGGGAGCTGG GCACCACCTT 420
CTGCAAACCTG CACTCCTCCA TCTTCTTTCT CAACATGTTT GCCAGCGGCT TCCTGCTCAG 480
CGCCATCAGC CTGGACCGCT GCCTGCAGGT GGTGCGGCCG GTGTGGGGCG AGAACCACCG 540
CACCGTGGCC GCGGCGCACA AAGTCTGCCT GGTGCTTTGG GCACTAGCGG TGCTCAACAC 600
GGTGGCCCTAT TTCGTGTTCC GGGACACCAT CTCGCGGCTG GACGGGCGCA TTATGTGCTA 660
CTACAATGTG CTGCTCCTGA ACCCGGGGCC TGACCGCGAT GCCACGTGCA ACTCGGCCCA 720
GGCGGCCCTG GCCGTCAGCA AGTTCCTGCT GGCCTTCCTG GTGCCGCTGG CGATCATCGC 780
CTCGAGCCAC GCGGCCGTGA GCCTGCGGTT GCAGCACCGC GGCCGCCGGC GGCCAGGCCG 840
CTTCGTGCGC CTGGTGGCAG CCGTCGTGGC CGCCTTCGCG CTCTGCTGGG GGCCCTACCA 900
CGTGTTCAGC CTGCTGGAGG CGCGGGCGCA CGCAAACCCG GGGCTGCGGC CGCTCGTGTG 960
GCGCGGGCTG CCCTTCGTCA CCAGCCTGGC CTTCTTCAAC AGCGTGGCCA ACCCGGTGCT 1020
CTACGTGCTC ACCTGCCCCG ACATGCTGCG CAAGCTGCGG CGCTCGCTGC GCACGGTGCT 1080
GGAGAGCGTG CTGGTGGACG ACAGCGAGCT GGGTGGCGCG GGAAGCAGCC GCCGCCCGCG 1140
CACCTCCTCC ACCGCCCGCT CGGCCTCCCC TTTAGCTCTC TGCAGCCGCC CGGAGGAACC 1200
```

GCGGGGCCCC GCGCGTCTCC TCGGCTGGCT GCTGGGCAGC TGGCAGCGT CCCCAGAC 1260
GGGCCCCCTG AACCGGGCGC TGAGCAGCAC CTCGAGTTAG AACCGGGCCC ACGTAGGGCG 1320
GCACTCACAC GCGAAAGTAT CACCAGGGTG CCGCGGTTCA ATTCGATATC CGGACTCCTG 1380
CCGCAGTGAT CAAAGTCCGA GGGGCGGGAC CCAGGCACCT GCATTTTAAA GCGCCCCGGG 1440
AGACTCTGAA TCTTTTTCAG AAACAGTGAG TTAAAGCAGT GCTTCTCAA CTTGATGTG 1500
CCTGTGAATC ACCTAGGGGT CTGTGTAAGT GCAGTCTGAT CCAGGAGGCC GGGGCGGGT 1560
ACTGAGAGTC TGCCTTAAC AAGCTCCCAG GCCGAGAAGC CAGTGCGGCA GGTTCACAGG 1620
CGAGGCCTGG AGTAACACAA AGTGAACTC GTAATAGACT TCCACTCTA GGGCAGTGA 1680
GTCGGAAGGG CACACGGGGT GCGTCTCCCC GGAGTTCAGT TTTACCAGAT GATGGGGGAG 1740
GGGGGAAGGA GTTTTATGTT AAACCATCCA TGTATTTTGG GAGAAGAGAG AGGAAAGGTT 1800
TGAGAAGCAC TGTTCAGCC TGCCCTCTTC ATTTAGCCAA TGCTTACTGC GCTAGACGCT 1860
TCATCCCACA ATCTTAAGGG GCAGCTTCTA TTAGCCAGTC TTTACAGCTG AGCACATTCT 1920
GGCTCAGGGA GGTAAAGTGA CTTGCCAGT TTCAGGGCTA ACGACCACAG GGTCTGCACT 1980
CTAACCTAG GCATCACATG CTCAATGACT CTCTGGTGAG CGAGGACATT CTCTGACCTA 2040
CTCGAGGGAC TTAAGATGCT ACCTTGTGAC CCAGCACTGC CCAAAGTGCT TCCAAGGCAG 2100
AAGCAGCAGG GGATGGCGTG GTCAAGCACT CGGGAAACCT GGGGCTAATC AAATCCAATG 2160
GGGGAAATGA CTAAGTCT TCGGTCGTTA GAAGTTGAAT GGGCACAGCA ACTCTAAGAC 2220
TACAGCACAC GTCATTTCTT AGCTAAGCGG ACCAGCCTCC CTGTGGCCT GGTGTTCTGT 2280
GGGATCCCTC TGGGCACTGG TAATCCCAAG ATCTGTGCAG CCGGCCTCC AGGCCACATG 2340
GGGCTGGGCA GCTACCATT CCCTTTTGGG GATGGGAGGG GTAACCTGCA CCTCTGACCT 2400
ATCACTTCCA CTGCACCCCG TCTATTCTT CCACCTGCCG TGGACTTGGG GTCAGAGACT 2460
GCTGTGTTT AGCTCTGCAG CCCAGGGACC GAAAAGTTGG TGTCAATGAA TTTTGCTTGG 2520
TGGATGAAAT GTCAGTGGA GAAGCAGATG AGAACTCTT GAGATCTTG TCCTGTGTTT 2580
TTTCTGCCAC CAAAGGCCAG GGTCAGTGA GGCCTGGCCC ACAGCAGGTG CTGAGCAAAG 2640
GGAACAGTGA GGTGCCCAGC TAGCTGCAGA GCCACCCTGT GTTGACACCT CGCCCTGCT 2700
CCCTCCCATC CCTTCCCCCT TTAATCATAG CACTTCCCCC ATTGGACAG TGGTGCAATT 2760
TGCTTGTTTA TTATGTTTT TCTCCATCAG AATGAAAGCT CCTCGAGGGC AGGGACTTTG 2820
GTCTATTGTC TGTATTTGCC GGTGCCTAGG ATTGTGCCTG TATGCAACAG GCACTCAATA 2880
AATATTTTGT CTGTAGACTG GAAAAAAAAA A 2911

配列番号 : 6

配列の長さ : 395

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 不明

配列の種類 : 蛋白質

起源

ヒトTh2 (B19)

配列

Met Ser Ala Asn Ala Thr Leu Lys Pro Leu Cys Pro Ile Leu Glu Gln	16
Met Ser Arg Leu Gln Ser His Ser Asn Thr Ser Ile Arg Tyr Ile Asp	32
His Ala Ala Val Leu Leu His Gly Leu Ala Ser Leu Leu Gly Leu Val	48
Glu Asn Gly Val Ile Leu Phe Val Val Gly Cys Arg Met Arg Gln Thr	64
Val Val Thr Thr Trp Val Leu His Leu Ala Leu Ser Asp Leu Leu Ala	80
Ser Ala Ser Leu Pro Phe Phe Thr Tyr Phe Leu Ala Val Gly His Ser	96
Trp Glu Leu Gly Thr Thr Phe Cys Lys Leu His Ser Ser Ile Phe Phe	112
Leu Asn Met Phe Ala Ser Gly Phe Leu Leu Ser Ala Ile Ser Leu Asp	128
Arg Cys Leu Gln Val Val Arg Pro Val Trp Ala Gln Asn His Arg Thr	144
Val Ala Ala Ala His Lys Val Cys Leu Val Leu Trp Ala Leu Ala Val	160
Leu Asn Thr Val Pro Tyr Phe Val Phe Arg Asp Thr Ile Ser Arg Leu	176
Asp Gly Arg Ile Met Cys Tyr Tyr Asn Val Leu Leu Leu Asn Pro Gly	192
Pro Asp Arg Asp Ala Thr Cys Asn Ser Arg Gln Ala Ala Leu Ala Val	208
Ser Lys Phe Leu Leu Ala Phe Leu Val Pro Leu Ala Ile Ile Ala Ser	224
Ser His Ala Ala Val Ser Leu Arg Leu Gln His Arg Gly Arg Arg Arg	240
Pro Gly Arg Phe Val Arg Leu Val Ala Ala Val Val Ala Ala Phe Ala	256
Leu Cys Trp Gly Pro Tyr His Val Phe Ser Leu Leu Glu Ala Arg Ala	272
His Ala Asn Pro Gly Leu Arg Pro Leu Val Trp Arg Gly Leu Pro Phe	288
Val Thr Ser Leu Ala Phe Phe Asn Ser Val Ala Asn Pro Val Leu Tyr	304
Val Leu Thr Cys Pro Asp Met Leu Arg Lys Leu Arg Arg Ser Leu Arg	320

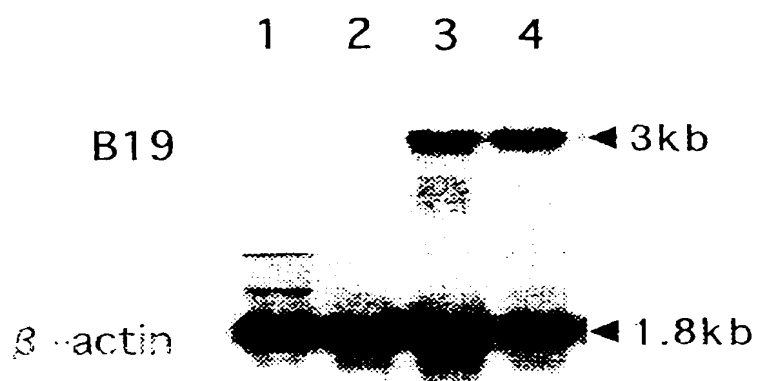
Thr Val Leu Glu Ser Val Leu Val Asp Asp Ser Glu Leu Gly Gly Ala 336
Gly Ser Ser Arg Arg Arg Arg Thr Ser Ser Thr Ala Arg Ser Ala Ser 352
Pro Leu Ala Leu Cys Ser Arg Pro Glu Glu Pro Arg Gly Pro Ala Arg 368
Leu Leu Gly Trp Leu Leu Gly Ser Cys Ala Ala Ser Pro Gln Thr Gly 384
Pro Leu Asn Arg Ala Leu Ser Ser Thr Ser Ser 395

請 求 の 範 囲

1. 配列番号 6 で表されるアミノ酸配列のヒト T h 2 特異的タンパク質。
2. 配列番号 6 で表されるアミノ酸配列の一部のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ請求項 1 記載のヒト T h 2 特異的タンパク質と実質的に同一の生物学的活性を有するヒト T h 2 特異的タンパク質。
3. 配列番号 6 で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むヒト T h 2 特異的遺伝子。
4. 配列番号 5 で表される塩基配列のヒト T h 2 特異的遺伝子。
5. 配列番号 5 で表される塩基配列の一部の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつストリンジェントな条件下で配列番号 5 で表される塩基配列の DNA とハイブリダイズし、さらに配列番号 6 で表されるアミノ酸配列を有するヒト T h 2 特異的タンパク質と実質的に同一の生物学的活性を有するヒト T h 2 特異的タンパク質をコードするヒト T h 2 特異的遺伝子。
6. 請求の範囲第 1 項乃至第 5 項のいずれかに記載された、ヒト T h 2 特異的遺伝子を含有する遺伝子発現用組換えベクター。
7. 請求の範囲第 6 項記載の遺伝子発現用組換えベクターで形質転換され、かつこの遺伝子発現用組換えベクターに含まれているヒト T h 2 特異的遺伝子が発現している形質転換体。
8. 請求の範囲第 1 項又は第 2 項に記載された、T h 2 特異的タンパク質のいずれかの部分を抗原決定基とし、かつヒト T h 1 特異的タンパク質との間においては免疫反応性を示さないモノクローナル抗体。
9. 請求の範囲第 8 項に記載された、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

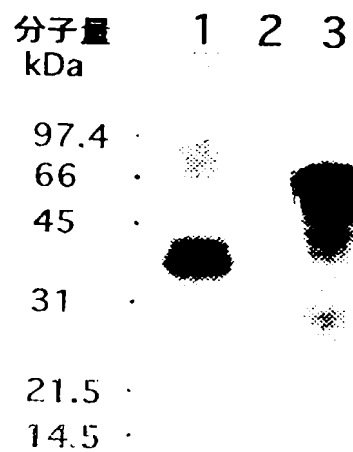
1/4

第 1 図



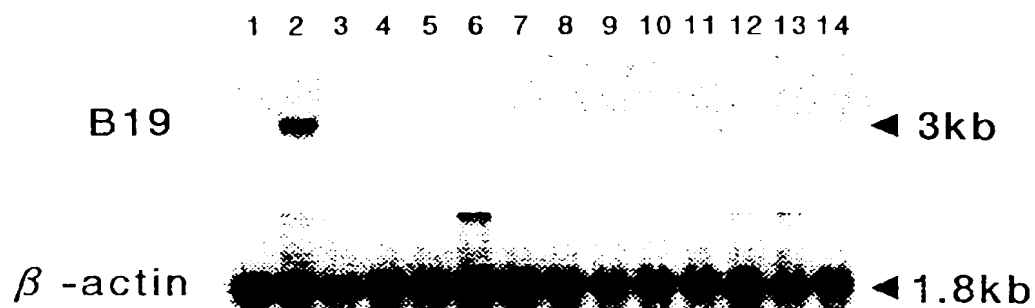
レーン 1	1P04	(Th1 タイプ)
レーン 2	2P15	(Th1 タイプ)
レーン 3	2P26	(Th2 タイプ)
レーン 4	KND4	(Th2 タイプ)

第 2 図



レーン 1 B19 産物
レーン 2 RNA ナシ
レーン 3 ルシフェラーゼ遺伝子産物
(ポジティブコントロール)

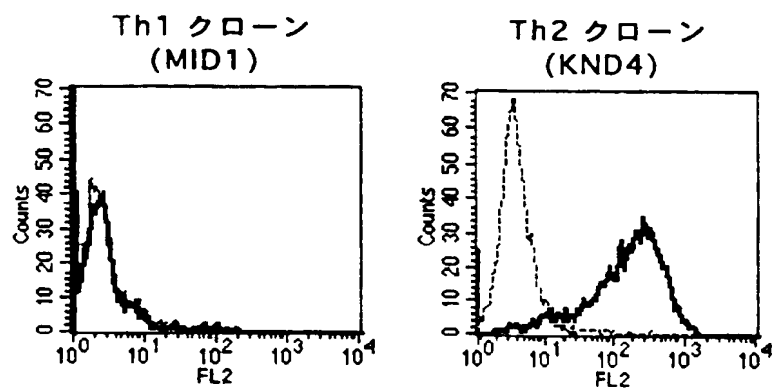
第 3 図



レーン:

1; 2P15
2; KND43; Jurkat
4; Molt 4
5; MT-2
6; TL-Mor
7; CCRF-CEM
8; Daudi9; LCL-Nag
10; U937
11; K562
12; HEL
13; Hela
14; Hep-G2

第 4 図



----- コントロール抗体

— 抗B19モノクローナル抗体

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12N15/12, C07K14/435, C12P21/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12N15/12-61, C07K14/435-79, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Medline, Biosis Previews, GenBank

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, A	WO, 96/27603, A1 (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.) (12. 09. 96) & AU, 9651783, A	1-9
A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS W32218, Hiller, L. et al., 'The WashU-Merck EST Project', 10. MAY. 1996	1-9
A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS N75434, Hiller, L. et al., 'The WashU-Merck EST Project', 29. MAR. 1996	1-9
A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS H63797, Hiller, L. et al., 'The WashU-Merck EST Project', 11. OCT. 1995	1-9
A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS H63756, Hiller, L. et al., 'The WashU-Merck EST Project', 11. OCT. 1995	1-9

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04. 09. 97

国際調査報告の発送日

17.09.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

平 田 和 男 印

4 B

7 8 2 3

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS R26634, Hiller, L. et al., 'The WashU-Merck EST Project', 24. MAY. 1995	1 - 9
A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS R49664, Hiller, L. et al., 'The WashU-Merck EST Project', 22. MAY. 1995	1 - 9
A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS R11893, Hiller, L. et al., 'The WashU-Merck EST Project', 11. APR. 1995	1 - 9
P, A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS W88584, Hiller, L. et al., 'The WashU-Merck EST Project', 05. JUL. 1995	1 - 9
P, A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS T15367, Berry, R. et al., 'Gene-based Sequence Tagged Sites (STSs) as the basis for a human gene map', 25. JUL. 1996, abstract, Nature Genet. 10, 415-423 (1995)	1 - 9
P, A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS AA243021, Hiller, L. et al., 'The WashU-Merck EST Project', 07. MAR. 1997	1 - 9
P, A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS AA195419, Hiller, L. et al., 'The WashU-Merck EST Project', 14. FEB. 1997	1 - 9
P, A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS AA126280, Hiller, L. et al., 'The WashU-Merck EST Project', 26. NOV. 1997	1 - 9
P, A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS AA011713, Hiller, L. et al., 'The WashU-Merck EST Project', 29. JUL. 1996	1 - 9
P, A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS AA011676, Hiller, L. et al., 'The WashU-Merck EST Project', 29. JUL. 1996	1 - 9
P, A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS W15244, Hiller, L. et al., 'The WashU-Merck EST Project', 10. OCT. 1996	1 - 9

PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 01 March 2001 (01.03.01)	
International application No.: PCT/JP00/05615	Applicant's or agent's file reference: PBM42/PCT
International filing date: 22 August 2000 (22.08.00)	Priority date: 23 August 1999 (23.08.99)
Applicant: HIRAI, Hiroyuki et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:
06 November 2000 (06.11.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/JP97/01906

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Biotechnology Information, LOCUS H63756, Hiller, L. et al., 'The WashU-Merck EST Project', 11. Oct. 1995	
A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS R26634, Hiller, L. et al., 'The WashU-Merck EST Project', 24. May. 1995	1 - 9
A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS R49664, Hiller, L. et al., 'The WashU-Merck EST Project', 22. May. 1995	1 - 9
A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS R11893, Hiller, L. et al., 'The WashU-Merck EST Project', 11. Apr. 1995	1 - 9
P,A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS W88584, Hiller, L. et al., 'The WashU-Merck EST Project', 05. Jul. 1995	1 - 9
P,A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS T15367, Berry, R. et al., 'Gene-based Sequence Tagged Sites (STSs) as the basis for a human gene map', 25. Jul. 1996, abstract, Nature Genet. 10, 415-423 (1995)	1 - 9
P,A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS AA243021, Hiller, L. et al., 'The WashU-Merck EST Project', 07. Mar. 1997	1 - 9
P,A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS AA195419, Hiller, L. et al., 'The WashU-Merck EST Project', 14. Feb. 1997	1 - 9
P,A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS AA126280, Hiller, L. et al., 'The WashU-Merck EST Project', 26. Nov. 1997	1 - 9
P,A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS AA011713, Hiller, L. et al., 'The WashU-Merck EST Project', 29. Jul. 1996	1 - 9
P,A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS AA011676, Hiller, L. et al., 'The WashU-Merck EST Project', 29. Jul. 1996	1 - 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/01906

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS W15244, Hiller, L. et al., 'The WashU-Merck EST Project', 10. Oct. 1996	1 - 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/01906

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl ⁶ C12N15/12, C07K14/435, C12P21/08		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Int. Cl ⁶ C12N15/12-61, C07K14/435-79, C12P21/08		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
Medline, Biosis Previews, GenBank		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	WO, 96/27603, A1 (Millennium Pharmaceuticals, Inc.), September 12, 1996 (12. 09. 96) & AU, 9651783, A	1 - 9
A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS W32218, Hiller, L. et al., 'The WashU-Merck EST Project', 10. May. 1996	1 - 9
A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS N75434, Hiller, L. et al., 'The WashU-Merck EST Project', 29. Mar. 1996	1 - 9
A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, LOCUS H63797, Hiller, L. et al., 'The WashU-Merck EST Project', 11. Oct. 1995	1 - 9
A	Database GenBank Rel. 100, National Center for	1 - 9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
September 4, 1997 (04. 09. 97)		September 17, 1997 (17. 09. 97)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.